

## 使用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统改善肽的CQA监测

Nilini Ranbaduge, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

### 摘要

Peptide MAM是一种直接分析生物治疗药物产品属性的LC-MS方法，在蛋白质生物治疗药物质量评估中的运用越来越多。在方法生命周期管理过程中，分析方法需要保持准确、一致，才能确保药品质量和安全性始终符合要求。就这方面而言，稳定的系统性能是获取优质MAM数据的关键。酸性肽在金属表面发生的非特异性吸附是一种众所周知的现象，会影响LC-MS分析，导致峰不对称、肽损失以及定量测量中检测器响应的差异性增加。本研究证明，装配惰性ACQUITY Premier产品的BioAccord系统得到的性能提升有助于提高肽回收率并获得稳定的MS响应，使动态范围横跨3个数量级的属性获得了重现性更高的结果。MaxPeak高性能表面(HPS)技术获得的性能提升证明，装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统在合规的waters\_connect信息学软件控制下非常适合作为实施MAM方法的LC-MS平台。

### 优势

- MaxPeak HPS系统和色谱柱表面可提升酸性肽回收率
- 低载样量下即可进行肽的质量属性监测
- 在高和低测量浓度下均获得稳定的MS信号
- 所监测属性的%RSD水平降低

### 简介

基于LC-MS技术的多属性方法(MAM)由于能够直接测量多种属性（例如产品变异和降解），在生物制药行业越来越受欢迎。这些方法可以补充甚至可能取代多种传统的光学分析方法，因为它们在单次分析中具有更高的专属性和灵敏度<sup>1</sup>。为此，业界为开发和验证MAM方法做了大量工作，以便在方法生命周期管理过程中考察药品的关键质量属性(CQA)<sup>1,2</sup>。分析方法需要稳定、准确且一致，才能确保在整个组织内轻松部署，以支持产品开发、生产和放行活动。显然，样品前处理、色谱稳定性、检测一致性和信息学处理等各个方面都会影响整体方法稳定性，目标属性的丰度（痕量）对方法性能和重现性构成了主要挑战。

近期有研究表明，在常规不锈钢液相色谱系统上执行通用RPLC-MS方法时，含有多个酸性残基（谷氨酸/天冬氨酸或带酸性修饰的残基）的肽的色谱性能会受到不利影响<sup>3</sup>。携带富电子基团（例如羧酸）的肽会与仪器和色谱柱的金属氧化物表面发生相互作用或形成吸附，导致这些金属敏感分析物的回收率下降、峰拖尾增加。此类吸附现象使Peptide MAM方法变得尤为困难，因为评估产品属性时，分析物的金属/表面相互作用带来的性能下降会导致定量准确度和方法重现性降低。研究人员付出了大量努力，试图在RPLC分析中减少这些金属-肽相互作用，但使用替代离子对试剂、钝化和高离子强度溶剂可能需要开发额外的方法，且这些方法不一定与MS兼容<sup>4,5</sup>。这些缓解策略虽已证明可以改善色谱性能，但在方法优化过程中必须慎重考虑，因为引入额外方法会增加方法复杂性，进而加大与方法稳定性相关的风险。ACQUITY Premier UPLC系统专为改善酸性化合物分析的色谱性能而设计，无需开发额外的方法或展开大量优化工作。在液相色谱系统和色谱柱硬件的高表面积组件中采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术即可实现这一目标，该技术通过引入屏障层大幅减少金属敏感分析物的分析物/表面相互作用<sup>6</sup>。本研究的目的是证明MaxPeak HPS技术对MAM方法的作用，该技术能够改善金属敏感分析物的回收率<sup>7</sup>和峰形，在不改变RPLC-MS方法或条件的情况下提高方法灵敏度和稳定性。

## 实验

### 样品描述

将mAb胰蛋白酶酶解标准品（部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)）溶于200  $\mu\text{L}$  0.1%甲酸中，得到最终浓度为0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的样品。该样品的进样体积为5.0  $\mu\text{L}$  (1.0  $\mu\text{g}$ )。

### 方法条件

同时在(1)装配ACQUITY UPLC I-Class PLUS（不锈钢）的BioAccord系统和(2)装配ACQUITY Premier（惰性MaxPeak HPS）的BioAccord系统上采集数据，用于直接比较。采用的色谱柱技术与各系统架构一致，搭配常用的固定相填料。

## 液相色谱条件

检测条件:	TUV, MS
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶 (部件号: 186009186)
色谱柱:	(1) ACQUITY UPLC CSH C <sub>18</sub> 肽分析专用柱 (部件号: 186006938) (2) ACQUITY Premier CSH C <sub>18</sub> 肽分析专用柱 (部件号: 186009489)
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	空白样10 µL, 样品2-10 µL
流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液

## 质谱条件

质谱系统:	ACQUITY RDa检测器
电离模式:	ESI+
采集范围:	m/z 50-2000
毛细管电压:	1.2 kV

碰撞能量： 60-120 V

锥孔电压： 20 V

## 数据管理

信息学软件： 搭载Peptide MAM应用程序的  
waters\_connect, LC-MS工具包

## 结果与讨论

本研究并排比较了常规不锈钢流路BioAccord系统与配备惰性MaxPeak HPS表面ACQUITY Premier液相色谱系统和色谱柱的BioAccord系统（图1）。此比较评价的两种BioAccord平台均含ACQUITY RDa质谱检测器，并使用waters\_connect Peptide MAM应用程序工作流程生成结果。利用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统分析NIST mAb标准品酶解物的选定CQA，通过分析物回收率、方法灵敏度和重现性评估该系统对MAM方法的系统性能和适用性。



图1.装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统。ACQUITY Premier产品包含采用MaxPeak高性能表面(HPS)的流路、筛板和色谱柱，可减少金属表面对分析物的吸附。

## 提高回收率

天冬酰胺脱酰胺化形成天冬氨酸和异天冬氨酸，是单克隆抗体(mAb)的常见PTM，已被证明会影响mAb的有效性和疗效<sup>8</sup>。在mAb类药品的开发过程中，需要对容易发生脱酰胺的序列频繁进行表征和监测，使生物治疗药物的质量始终如一。“PENNY”肽有一个序列带有多个可能的脱酰胺位点，这些位点据称会影响抗原结合<sup>8</sup>。该序列位于重链恒定区(Fc)，是一种需要在mAb类生物治疗药物的开发和生产过程中常规监测的肽，以监测工艺一致性和产品质量。NISTmAb参比抗体用胰蛋白酶酶解后，HC:T37“PENNY”肽已经包含四个酸性残基（序列：GFYPSD IAVEWESNGQPENNYK），非常容易吸附到液相色谱系统流路和色谱柱硬件的金属表面，因此成为评价MaxPeak Premier HPS技术的理想候选分析物。

在这项比较研究中，采用两套系统均观察到PENNY肽中通常监测的两个脱酰胺位点（图2A，峰1和2），以及琥珀酰亚胺中间体对应的峰（图2A插图）。虽然在两个数据集中均观察到脱酰胺位点，但装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统回收率明显更高，“PENNY”肽及其相关变体的MS信号强度提高至2倍以上，如图2B所示。有趣的是，脱酰胺峰1虽然可见，但由于其回收率低且峰形不佳，因此低于常规数据集中处理方法的检测限。本文数据展示了MaxPeak HPS技术如何能够改善数据分析，特别是在使用相同处理方法的自动化工作流程中。

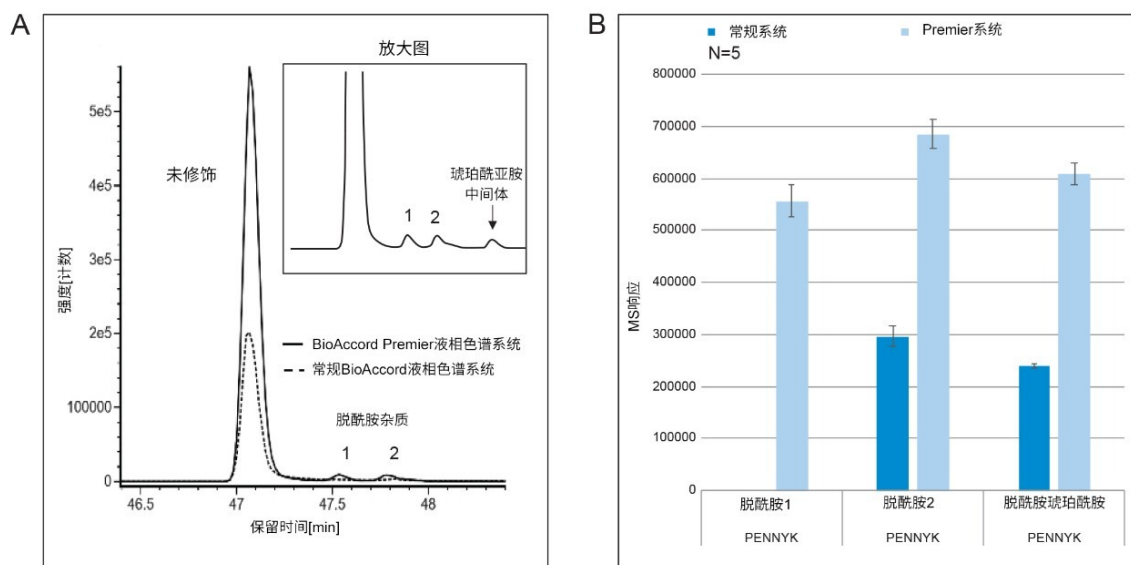


图2.回收率比较。A) NIST mAb标准品的胰蛋白酶酶解物中HC:T37肽片段（序列：GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK）及相关杂质的提取离子色谱图(XIC)；虚线表示在常规BioAccord系统上的分离结果，实线表示在装配ACQUITY Premier产品（采用MaxPeak HPS技术）的BioAccord系统上的分离结果。B)在两套系统上，根据5次进样计算HC:T37杂质的总归一化峰面积。

此外，观察到MaxPeak Premier HPS技术表现出的性能提升直接影响MS数据的质量。如图3所示，PENNY肽及其相关变体的回收率提高导致PENNY肽的b/y碎片离子数量和强度增加(3 vs. 7)。这些数据表明，ACQUITY Premier技术可提高产品质量属性相关肽的回收率，从而在MAM方法中改善峰归属的可信度。

## 稳定耐用的技术

开发能够在整个组织内轻松扩展和部署的耐用方法，对于保持分析效率和促进实验室之间更轻松的方法转换至关重要。LC-MS方法在由不同实验室处理复杂性和浓度可能各异的样品时尤其具有挑战性。如之前的数据所示，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier能够改善金属敏感肽的回收率和MS响应。

为进一步评价装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统在支持开发和生产活动方面的稳定性，我们在较宽浓度范围内(0.1  $\mu\text{g}$ –2.0  $\mu\text{g}$ )监测了一组产品质量相关属性（表1）。如图4所示，采用MaxPeak Premier技术的BioAccord系统能够准确、一致地报告测量范围内属性的峰面积%，大多数属性单个属性的%RSD不超过20%。这种性能稳定性的示例可在DTLMISR氧化修饰中观察到，随着载样量增加，获得的响应始终如一，计算的%RSD为6.3%。低丰度物质（特别是糖肽）在较低载样量下表现出较高的变异性，不过这一结果并非完全出乎意料，因为糖肽难以电离，其MS响应仅为肽酶解物基峰响应的1.03%。这些数据说明，BioAccord系统与ACQUITY Premier产品一起构成一个稳定的LC-MS平台，可在实验室广泛应用，支持开发和生产活动，并且非常适合MAM方法，这些方法本身要求仪器能够检测不同丰度水平的多种分析物。

肽序列	修饰	平均修饰水平%
VVSVLTVLHQDWLNGK	(基峰)	95.52%
DIQMTQSPSTLSASVGDR	氧化	0.94%
DMIFNFYFDVWGQGTITVSSASTK	氧化	1.02%
DTLMISR	氧化	1.60%
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺1	2.06%
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺2	1.72%
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺琥珀酰胺	1.88%
VTNMDPADTATYYCAR	氧化	0.74%
VVSVLTVLHQDWLNGK	脱酰胺1	1.01%
VVSVLTVLHQDWLNGK	脱酰胺琥珀酰胺	2.92%
<b>糖肽</b>		
EEQYNSTYR	(基峰)	1.03%
EEQYNSTYR	G0F	43.30%
EEQYNSTYR	G1F	40.47%
EEQYNSTYR	G2F	9.06%
EEQYNSTYR	G0F-GlcNAc	1.82%
EEQYNSTYR	G1F-GlcNAc	2.82%
EEQYNSTYR	Man5	1.40%

表1.在BioAccord Premier系统上测得的不同载样量(0.1 µg–2.0 µg) NIST mAb酶解物的关键质量属性选定列表

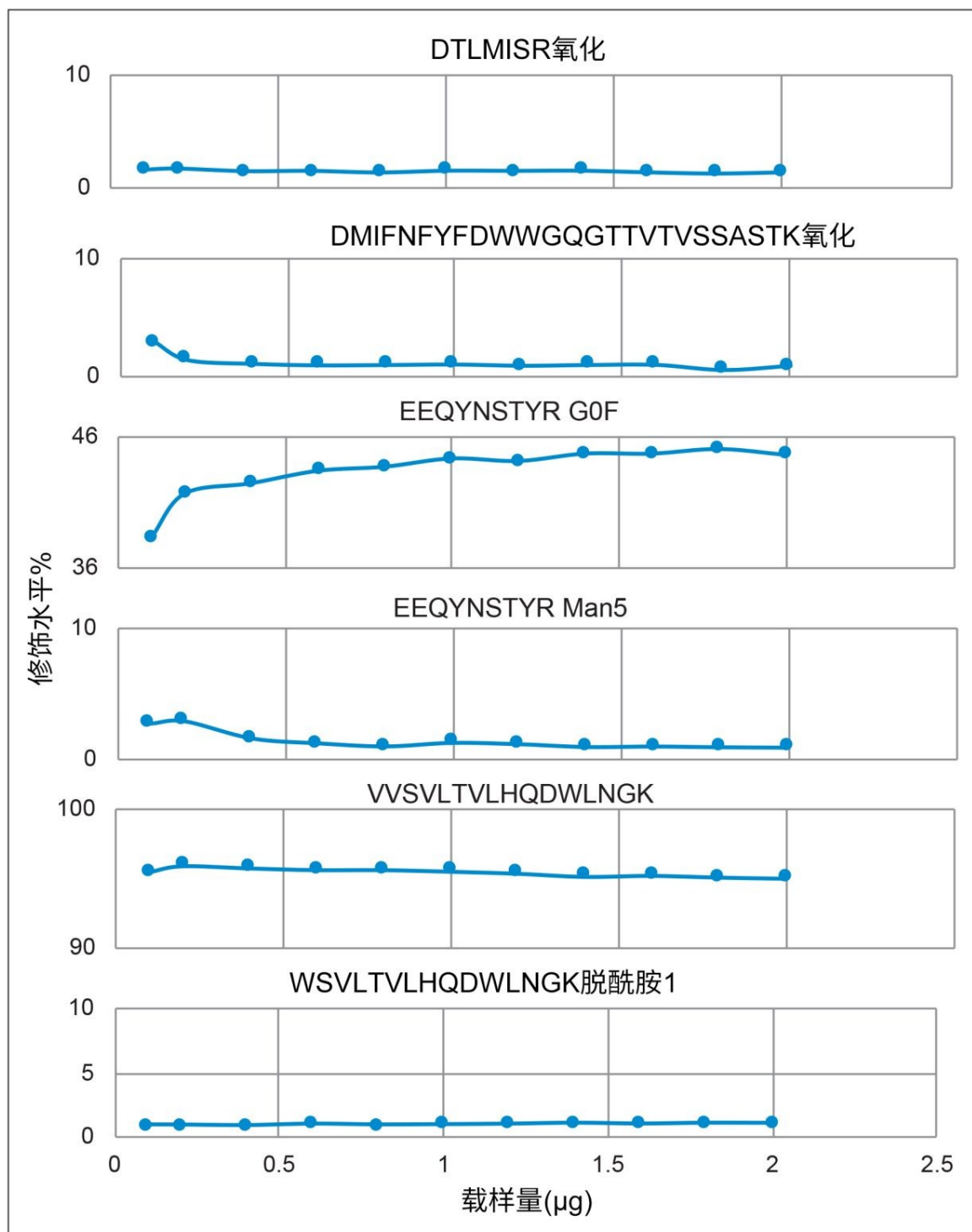


图4.性

能一致性。基于载样量增加时的归一化MS响应百分比计算得出的NISTmAb RM 8671的CQA修饰百分比。

### 可重现且适用性广泛

如前文所述，装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统作为LC-MS平台可提供一致且准确的结果，能够支持



整个组织的分析需求。然而，MAM方法在线性动态范围方面存在特定挑战。从根本上讲，确定某一简单方法动态范围的概念取决于该方法对设定可接受标准时所用标准品的准确度和精密度的。而对于MAM方法而言，由于其动态范围代表多种分析物的谱图，这些分析物的基线肽电离效率及其未修饰形式的相对丰度各不相同，因此格外困难。为确保MAM方法对CQA实现可重现且准确的测量，LC-MS平台必须能够对给定分析物表现出线性响应，并具有较宽的谱图动态范围，才能处理复杂样品。

为评价这一实际的动态范围问题，我们将T26肽片段基峰（序列：VVSVLTVLHQDWLNGK）的归一化响应相对于不断增加的载样量作图。如图5A所示，当载样量高于1.2 µg时，观察到MS离子源饱和，线性范围为0.1 µg–1.0 µg， $R^2=0.99$ 。根据该信息，将载样量1 µg确定为可接受的载样量，此时没有峰超过响应上限，并对痕量CQA具有出色的灵敏度。如图5B所示，BioAccord Premier液相色谱系统能够以高重现性（响应%RSD=2.78%）检测到T25肽片段（序列：EEQYNSTYR）的Man 5糖基化物质（基峰的0.08%）。更值得注意的是，谱图内检测器响应代表了横跨3个数量级的谱图动态范围。因此，装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统能够为多种肽分析物采集准确且可重现的数据，提供的灵敏度非常适合日常使用MAM方法。表2进一步证明了这一点，使用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统执行MAM方法时，观察到所监测属性的%RSD低于4%，而常规BioAccord系统高达该值的1.5–2.5倍。如预期一样，在含有酸性残基的肽中观察到更大差异，由此证明了MaxPeak HPS技术带给MAM方法的价值。

肽序列	修饰	修饰水平% 常规系统	修饰水平% ACQUITY Premier 系统	%RSD 常规系统	%RSD ACQUITY Premier 系统
VVSVLTVLHQDWLNGK	(基峰)	95.88	96.55	0.04	0.06
DIQMTQSPSTLSASVGDR	氧化	0.86	0.86	7	4
DMIFNFYFDVWGQTTVTVSSASTK	氧化	1.69	1.06	7.3	1.18
DTLMISR	氧化	1.33	1.66	3.05	3.45
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺1	2.1	1.71	7.4	2.81
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺2	-	2.1	-	1.33
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	脱酰胺琥珀酰胺	1.99	1.87	2.68	0.89
VTNMDPADTATYYCAR	氧化	0.46	0.67	7.45	2.4
VVSVLTVLHQDWLNGK	脱酰胺1	0.92	0.92	3.44	1.48
VVSVLTVLHQDWLNGK	脱酰胺琥珀酰胺	2.74	2.53	2.15	1.94
EEQYNSTYR	(基峰)	0.68	0.56	4.81	2.41
EEQYNSTYR	G0F	43.81	43.81	0.27	0.46
EEQYNSTYR	G1F	41.51	41.65	0.44	0.31
EEQYNSTYR	G2F	8.17	7.65	0.57	0.93
EEQYNSTYR	G0F-GlcNAc	2.36	2.47	2.68	1.41
EEQYNSTYR	G1F-GlcNAc	2.56	2.85	1.25	1.64
EEQYNSTYR	Man5	0.91	1	3.06	1.88

表2.使用常规系统和装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统在1 µg载样量下测得的NISTmAb关键质量属性的选定列表。表中报告了使用waters connect Peptide MAM应用程序确定的%修饰水平，以及在5次进样中测得的相应%RSD水平。

## 结论

为开发稳定耐用的Peptide MAM方法，所用的液相色谱系统要能够提供无偏差且一致的蛋白质酶解物分离。本研究评价了装配ACQUITY Premier产品（采用MaxPeak HPS技术）的BioAccord系统相比于常规不锈钢LC-MS平台，在基于RPLC-MS的Peptide MAM方法中使代表产品质量属性的肽获得理想色谱性能的能力。本项对比研究证明，MaxPeak HPS技术可大幅减少金属敏感分析物的吸附，提供耐用方法，并获得更高的回收率、分析灵敏度和方法重现性。综上，装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统是一款稳定而灵活的LC-MS平台，非常适合部署在开发、生产和质量控制组织中。

## 参考资料

1. Rogers, R.S., *et al.*, Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-Attribute Method for Characterization, Quality Control Testing and Disposition of Biologics.MAbs, 2015.7(5): p. 881–90.
2. Rogstad S, Yan H, Wang X, *et al.* Multi-Attribute Method for Quality Control of Therapeutic Proteins. *Analytical Chemistry*. 2019 Nov;91(22):14170-14177.DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03808.
3. Heaton, J.C. and D.V. McCalley, Some Factors That Can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic Interaction Chromatography, and Possibilities for Their Remediation.*Journal of Chromatography A*, 2016.1427: p. 37–44.
4. Wakamatsu, A., *et al.*, A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction With Stainless-Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry.*Journal of Separation Science*, 2005.28: p. 1823-1830.
5. Robert E. Birdsall, Jacob Kellett, Ying Qing Yu, Weibin Chen, Application of Mobile Phase Additives to Reduce Metal-Ion Mediated Adsorption of Non-Phosphorylated Peptides, *Journal of Chromatography B*, vol 1126–1127, 2019.
6. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham KD.Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions With Metal Surfaces In UHPLC.*Anal Chem*.2021 Apr 13;93(14):5773–5781.doi: 10.1021/acs.analchem.0c05203.*Epub* 2021 Apr 2.PMID: 33798331.

7. Robert E. Birdsall, Jacob Kellett, Samantha Ippoliti, Nilini Ranbaduge, Matthew A. Lauber, Ying Qing Yu, Weibin Chen, Reducing Metal-Ion Mediated Adsorption of Acidic Peptides in RPLC-Based Assays Using Hybrid Silica Chromatographic Surfaces, *Journal of Chromatography B*, 2021, 122700, ISSN 1570-0232.

## 特色产品

- [装配ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537)
- [ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)
- [ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)
- [ACQUITY RDa检测器 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027)

720007351ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.